



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 **Gebrauchsmusterschrift**
10 **DE 201 11 308 U 1**

51 Int. Cl. 7:
B 01 L 11/00
C 12 Q 1/68
C 09 J 7/00

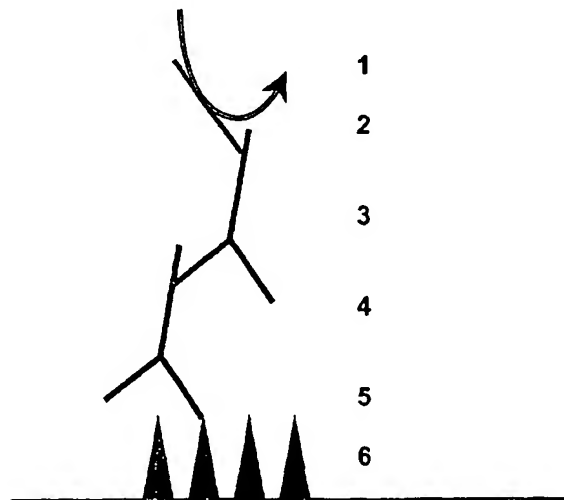
21 Aktenzeichen: 201 11 308.2
22 Anmeldetag: 11. 7. 2001
47 Eintragungstag: 20. 12. 2001
43 Bekanntmachung
im Patentblatt: 31. 1. 2002

DE 201 11 308 U 1

- 56 Innere Priorität:
200 12 307. 6 12. 07. 2000
- 73 Inhaber:
Roboscreen Gesellschaft für molekulare
Biotechnologie mbH, 04129 Leipzig, DE
- 74 Vertreter:
Baumbach, F., Dr.rer.nat. Pat.-Ing., Pat.-Ass., 13125
Berlin

54 Verschlussvorrichtung für Mehrfach-Reaktionsräume

- 57 Universell einsetzbare, zweiteilige Verschlussvorrichtung für Mehrfachreaktionsräume, dadurch gekennzeichnet, daß sie
- a) als Abdichtungsmaterial der Reaktionsräume ein transparentes, strahlendurchlässiges, gasdichtes, hitzestabiles Verschlussmaterial aufweist, über das
- b) eine deckungsgleiche, flexible Lochmaske positioniert ist, die aus einem flexiblen und thermostabilen Material besteht und mindestens soviel Fenster mit geeignetem Durchmesser aufweist, wie Mehrfachreaktionsräume vorhanden sind, welche so angeordnet sind, daß sie sich beim Auflegen auf den Mehrfachreaktionsraum jeweils exakt über der Mitte der Einzelkavitäten befinden.



DE 201 11 308 U 1

Verschlußvorrichtung für Mehrfach-Reaktionsräume

Beschreibung

Viele Bereiche in der klinischen Forschung und Diagnostik, der pharmakologischen Wirkstoffprüfung, Veterinärmedizin sowie der Lebensmittelanalytik machen es erforderlich, die Konzentration ausgewählter Proteine in einer zu analysierenden Probe exakt zu kennen. Neben chemischen Analyseverfahren kommen hierfür häufig Enzym-Immunoassays (ELISAs) zur Anwendung, die eine untere Nachweisgrenze von ca. 1-10 ng Analytprotein pro ml erreichen. Um niedrigere zu erfassen, bedient man sich sog. Radioimmunoassays (RIAs), in denen radioaktiv markierte Antikörper Verwendung finden. Hiermit wird eine unterer Nachweisgrenze von ca. 10^{-18} mol Protein erreicht. Diese zwar äußerst sensitive Methode ist aber mit den Nachteilen verbunden, daß mit der Anwendung der RIA-Technologie erhebliche Gesundheitsrisiken für den Anwender verbunden sind und große Mengen radioaktiv kontaminierter Abfälle anfallen, die nachweispflichtig und kostenintensiv entsorgt werden müssen. Ein neuartiger Lösungsansatz des Problems besteht in der Anwendung des Prinzips der Immuno-Polymerasekettenreaktion (iPCR), welche die hohe Spezifität der Antigen/Antikörper-Reaktion mit der hohen Sensitivität der Polymerasekettenreaktion (PCR) kombiniert (Abb.1). Potentielle Anwendungsmöglichkeiten der Technologie bestehen in der Entwicklung von ultrasensitiven, nichtradioaktiven Assays zur Bestimmung von extrem niedrigen Proteinkonzentrationen wie z.B. von Gliadinen in diätetischen Lebensmitteln oder von endokrinologischen Tests zur Messung von Serum-Hormonkonzentrationen (z.B. Leptin, Wachstumshormon).

Der gegenwärtige Stand der iPCR-Technik geht davon aus, daß die hierbei anfallenden, finalen PCR-Produkte noch mit konventionellen Nachweistechiken, insbesondere Agarosegel-Elektrophorese kombiniert mit nachfolgenden bildgebenden Verfahren, detektiert werden (Sano T. et al, Science 1992, 258: 120-122, Zhou H. et al, Nucl. Acids Res. 1993, 21: 6038-6039, Chang T.C. et al, J. Immunol. Meth. 1997, 208: 35-42, Case M. et al, Biochem. Soc. Trans. 1997, 25: 374, Saito K. et al, Clin. Chem. 1999, 45: 665-669). Dies ist in der Regel zeitaufwendig und birgt zahlreiche Fehlermöglichkeiten in sich. Modernere Nachweistechiken, sog. Real-Time- (RT) PCR-Produkt-Detektionsmethoden, erlauben hingegen, PCR-Reaktion und Fluoreszenzdetektion der entstehenden Produkte simultan in einem Schritt durchzuführen (Köhler T. et al., J. Lab. Med. 23: 408-414). Die zugehörige Analysetechnik ist u.a. von der Fa. PE Biosystems (Weiterstadt, Deutschland) in Form des ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection Systems oder GeneAmp® 5700 Sequence Detection System, die nach dem sog. TaqMan®-Prinzip arbeiten, sowie der Fa. Roche Molecular Biochemicals (Penzberg, Deutschland) in Form des LightCyclers™

verfügbar. Nach Analyse der aufgenommenen Rohdaten können diese Geräte mit Hilfe definierter Standards sofort eine Eichkurve erstellen, anhand der automatisch die Konzentration des Analyten in der Probe berechnet werden kann. Versuche, iPCR und Real-Time-Detektion miteinander zu kombinieren, sind deshalb naheliegend.

Das Hauptproblem der Umsetzung bestand bislang darin, daß die TaqMan®-Technik spezielle Polypropylen-Reaktionsgefäße erfordert, die – gasdicht verschlossen mit Laserlicht-durchlässigen "Optical Caps"- Amplifizierung, Fluoreszenzanregung und Messung gleichzeitig und direkt im Tube erlauben. Diese Reaktionsgefäße, die speziell für die RT-PCR konzipiert wurden, sind aber mit dem Nachteil behaftet, daß sie bevorzugt für die Messung von Nukleinsäuren geeignet sind, somit nur eine sehr geringe Proteinbindung zulassen und deshalb für iPCR-Anwendungen weitgehend ungeeignet sind. Zudem ist das TaqMan®-zugehörige Verbrauchsmaterial verhältnismäßig teuer und in der Regel nicht für ein automatisches Processing (z.B. mit einem Mikrotiterplatten-Wascher) geeignet. Die Verwendung einer kombinierten Real-Time-iPCR-Technik (RT-iPCR) unter Nutzung besser geeigneter Mikrotiterplatten oder -strips mit hoher Proteinbindungskapazität war somit bisher nicht möglich.

Aufgabe der Erfindung war es deshalb, die Nachteile des Standes der Technik abzustellen. Das Problem wurde dadurch gelöst, daß anstatt der ungeeigneten TaqMan®-Reaktionsgefäße herkömmliche PCR-geeignete, proteinabsorbierende Mikrotiterplatten oder -strips (Mehrfachreaktionsräume) verwendet werden, die nach Ausführung der Immunreaktion und Dispensierung des PCR-Reaktionsmixes in die Kavitäten erfindungsgemäß mit einer geeigneten, hitzebeständigen, transparenten Folie abgeschlossen werden. Weiterhin wurde erfindungsgemäß eine geeignete Lochmaske konstruiert, welche sowohl eine optimale Anregung durch energiereiche Strahlen in den Reaktionskavitäten zuläßt als auch eine maximale Wärmeübertragung von der herkömmlichen Deckelgegenheizung ausgewählter PCR-Geräte auf die prozessierten Strips oder Mikrotiterplatten erlaubt. In einer besonders bevorzugten Variante der Ausgestaltung besteht diese Lochmaske aus hitzestabilem Silikongummi. Diese erfindungsgemäße Verschlußvorrichtung ist universell einsetzbar und ebenso zum Verschließen von Reaktionsräumen, wie sie bei konventioneller qualitativer oder quantitativer RT-PCRs genutzt werden, verwendbar.

Das Wesen der Erfindung liegt in einer Kombination bekannter Elemente und neuer Lösungswege, die sich gegenseitig beeinflussen und in ihrer neuen Gesamtwirkung einen Gebrauchsvorteil und den erstrebten Erfolg ergeben, der darin liegt, daß nunmehr erstmalig qualitative oder quantitative RT-PCR oder RT-iPCR Analysen direkt in hitzestabilen, für

PCR geeigneten Mikrotiterplatten oder Strips mit hoher Proteinbindungskapazität durchgeführt werden können. Neben dem Abstellen der oben genannten Nachteile des Standes der Technik weist das erfindungsgemäße Verfahren somit eine Reihe von Vorteilen auf:

- Die RT-iPCR ist nunmehr in der Detektion wie eine konventionelle RT-PCR zu handhaben, somit bedeutend einfacher, schneller und wesentlich genauer in der Anwendung.
- Die Beschränkung auf spezifische Reaktionsräume (Optical Tubes, Optical Plates) entfällt, eine wesentlich breitere Palette von Reaktionsräumen ist somit einsetzbar.
- Es können erstmalig Reaktionsräume verwendet werden, die bevorzugt für den Proteinnachweis entwickelt wurden, somit optimale Proteinbindungseigenschaften aufweisen, aber auch bei hohen Temperaturen von bis zu 110°C einsetzbar sind, wie es beispielsweise für die PCR erforderlich ist (z.B. TopYield™ Strips, Nunc, Roskilde, Dänemark).
- Da ein sehr viel breiteres Spektrum von Reaktionsräumen für enzymatische "Real-Time"- Amplifikationen zugänglich ist, sind somit die Kosten für Verbrauchs-Plastik deutlich zu senken.
- Die Lochmaske ist beliebig oft wiederverwendbar, dadurch werden die Kosten für Einweg-Verschlußmaterial deutlich gesenkt.

Die erfindungsgemäße Anwendung der Vorrichtung liegt in Testkits zur Bestimmung ausgewählter Nukleinsäuren oder Proteine biologischen Herkunft mittels RT-PCR oder RT-iPCR. Die Testkits bestehen aus mindestens einer transparenten, hitzestabilen Verschlußfolie, einer flexiblen, hitzestabilen Lochmaske, einem hitzestabilen Mehrfachreaktionsraum sowie den zugehörigen Standard-Proteinen, Antikörpern und Reagenzien.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die universell einsetzbare, zweiteilige Verschlußvorrichtung für Mehrfachreaktionsräume, dadurch gekennzeichnet ist, daß sie

- a) als Abdichtungsmaterial der Reaktionsräume ein transparentes, strahlendurchlässiges, gasdichtes, hitzestabiles Verschlußmaterial aufweist, über das
- b) eine deckungsgleiche, flexible Lochmaske positioniert ist, die aus einem flexiblen und thermostabilen Material besteht und mindestens soviel Fenster mit geeignetem Durchmesser aufweist, wie Mehrfachreaktionsräume vorhanden sind, welche so angeordnet sind, daß sie sich beim Auflegen auf den Mehrfachreaktionsraum jeweils exakt über der Mitte der Einzelkavitäten befinden.

Bevorzugt sind die Materialien a) und b) so angeordnet, daß sowohl eine Anregung von zugehörigen Chromophoren durch Energiequellen verschiedener Wellenlänge als auch eine Detektion simultan direkt im Reaktionsraum ungehindert durch die zweiteilige Verschlußvorrichtung erfolgen kann, wobei gleichzeitig eine gegebenenfalls erforderliche optimale Wärmeübertragung auf die Reaktionsräume sowie Volumenkonstanz im Detektionsansatz durch geeignete Gegenheizungsanordnungen möglich ist.

Als Abdichtungsmaterial a) werden vorzugsweise selbstklebende Folien oder Klebestreifen verwendet, bei dem thermostabilen Material b) handelt es sich bevorzugt um Silikongummi.

Die Verwendung der Vorrichtung erfolgt zum Verschließen von Reaktionsräumen, die sowohl hohe Proteinbindung als auch Thermostabilität aufweisen, die vorzugsweise aus Polycarbonat oder Materialien mit vergleichbaren Bindungs- und Thermoeigenschaften bestehen, und die geeignet sind zur nachfolgenden Aufnahme in geeignete Meßgeräte. Weiterhin ist die Vorrichtung zum Verschließen von Reaktionsräumen geeignet, die für qualitative oder quantitative konventionelle oder Real-Time-PCR verwendet werden, sowie zum Verschließen von Reaktionsräumen, die für qualitative oder quantitative Real-Time-Immuno-PCR-verwendbar sind, und die geeignet sind zur nachfolgenden Aufnahme in entsprechende Meßgeräte, in Testkits zur Bestimmung ausgewählter Nukleinsäuren oder Proteine, wobei die Testkits bevorzugt aus mindestens einer Lochmaske, einer transparenten Verschlußfolie, einem ggf. mit mindestens einer Nukleinsäure oder einem Protein beschichteten Mehrfach-Reaktionsraum, sowie erforderlichen, ggf. DNA-konjugierten Antikörpern und Reagenzien für die Durchführung von Immunreaktionen, enzymatischen Amplifizierungsreaktion oder anderen signalverstärkenden Nachweisreaktionen bestehen.

Legenden zu den Abbildungen

Abb. 1 zeigt das Schema für den Ablauf einer quantitativen RT-iPCR zur Bestimmung von Gliadin für das Ausführungsbeispiel.

Abb. 2 zeigt die Draufsicht auf die erfindungsgemäß hergestellte Lochmaske aus Silikongummi (Maßstab 1:1) zur deckungsgleichen Auflage auf einen zuvor mit einer Verschlußfolie abgedichteten Mehrfach-Reaktionsraum.

Abb. 3 zeigt zwei unabhängig an verschiedenen Versuchstagen aufgenommene Standard-Referenzkurven für Gliadin. A) 100, 200, 400, 2000, 10000, 50000 pg Gliadin pro Kavität; B) 500, 1000, 2000, 10000, 50000 pg Gliadin pro Kavität. Alle Messungen erfolgten als Dreifachbestimmungen.

Ausführungsbeispiel: Messung von Gliadinen mittels quantitativer iPCR

Das folgende Beispiel dient der Verdeutlichung der Erfindung, ohne sie auf dieses Beispiel zu beschränken.

Materialien:

1. Hochgereinigtes Gliadin (Osman et al, Clin Chim Acta 1996, 255; 145-152)
2. Primärantikörper: Diese wurden durch Immunsierung von Kaninchen mit Gliadin erhalten (Osman et al., FEBS Lett. 1998, 433: 103-107).
3. DNA-konjugierte Sekundärantikörper: Anti-Kaninchen-Immunglobulin (Dako, Hamburg, Deutschland) wurde zur Konjugation mit einem DNA-Fragment eingesetzt. Dieses Fragment umfaßte 172 bp aus dem Kanamycingen (pET-29a-c (+) Vector) und wurde nach herkömmlichen Methoden an den Antikörper gekoppelt (Niemeyer C.M. et al, Nucl. Acids Res. 1994, 22: 5530-5539)
4. Spacer-Platte aus Silikongummi, Abmessungen: 115 x 80 x 3 mm, autoklavierbar und UV-stabil (Nunc, Roskilde, Dänemark). Diese wurde erfindungsgemäß folgendermaßen hergestellt: Spacer Plate auf Papierunterlage fixieren und konventionelle 96-Well- Trägerplatte für 0,2-ml-PCR-Gefäße auflegen, mittels Permanent-Marker Well-Mittelpunkte auf Silikonplatte fixieren und nachfolgend unter Zuhilfenahme eines Hand-Korkbohrers und eines Hammers oder ggf. einer Lochzange Scheiben mit einem Durchmesser von 4,0 mm ausstanzen und verwerfen. Vorgang für alle Positionen (d.h. insgesamt 96-mal) wiederholen. Die Löcher (Fenster) sind so angeordnet, daß sie sich beim Auflegen auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte exakt über der Mitte der "wells" befinden (Abb.2).
5. Scotch 3M 550 Transparent Tape (3M France, Cergy-Pontoise, Frankreich), 12 mm x 30 m oder Adhesive Sealing Film (ThinSeal™, Excel Scientific, Wrightwood, USA)
6. TopYield™ Strips (Nunc, Roskilde, Dänemark)
7. Waschpuffer: 10 mM Tris-HCl; pH 7,3, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20
8. Blockierungspuffer: Waschpuffer mit 3% Rinderserumalbumin
9. TaqMan® Primer und Sonde (BioTez GmbH, Berlin, Deutschland) (GenBank Accession Code: AJ 008006)
OSSI-fo1 (7430-7451) 5'-TCA.GGT.GCG.ACA.ATC.TAT.CGA.T-3'
OSSI-re2 (7475-7498) 5'-TTT.GCC.ATG.TTT.CAG.AAA.CAA.CTC-3'
OSSI-Taq1-3 (7455-7473) 5'-FAM-ATG.GGA.AGC.CCG.ATG.CGC.C-TAMRA

10. Reagenzienprämix für einen 50-µl-PCR-Ansatz: PCR grade H₂O (ad 50 µl); 10x ROX-Puffer (PE Biosystems; 5 µl); 50 mM MgCl₂ (4 µl); Nucleotid-Mix (10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 20 mM dUTP) (4 µl); 50 ng λ-DNA (AGS, Heidelberg, Deutschland; 5 µl); OSSI-fo1 (50 ng/µl) (2 µl); OSSI-re2 (50 ng/µl) (2 µl); OSSI-Taq1-3 (1,64 pmol, 5 µl); AmpliTaq Gold (1.25 U)

Ablauf der Messung

Schema siehe Abb.1, wobei 1 bis 6 die folgende Bedeutung besitzen

- 1 Real-time-PCR
- 2 dsDNA-Kanamycinfragment
- 3 Anti-Kaninchen-Immunglobulin konjugiert mit DNA
- 4 Kaninchen-Anti-Gliadin
- 5 Gliadin
- 6 Plastikoberflächen

Beschichtung der Platte mit Gliadin und Inkubation mit Antikörpern

1. Ein Milligramm Gliadin wird in 1 ml 60 % Ethanol gelöst. Aus dieser Lösung wird durch Verdünnung in Carbonatpuffer (50 mmol/l, pH 9,6) eine Gliadin-Verdünnungsreihe im Konzentrationsbereich von 50 ng/ml bis 200 pg/ml hergestellt.
2. Beschichtung von TopYield™-Strips mit Gliadin: Pro Kavität werden 50 µl der Probe über Nacht bei 4 °C inkubiert.
3. Die Kavitäten werden geleert, mit 10%igem Formaldehyd fixiert und anschließend mit Waschpuffer dreimal gewaschen.
4. Die freien Bindungsstellen werden mit Blockierungspuffer abgesättigt (1h bei 37°C) und die Kavitäten nochmals gewaschen.
5. Der Primär-Antikörper wird 1:400 verdünnt (Waschpuffer mit 1%igem Rinderserumalbumin), auf die Kavitäten aufgetragen und 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird viermal gewaschen.
6. Der DNA-konjugierte Sekundärantikörper wird 1:20.000 verdünnt (Waschpuffer mit 1%igem Rinderserumalbumin), auf die Kavitäten aufgetragen und 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die Platte dreißigmal gewaschen

Durchführung der quantitativen RT-iPCR

7. Nach Dispensieren von je 50 µl des PCR-Reagenzienprämixes (s.o.) in die vorgesehenen Kavitäten werden Einzelstrips mit Scotch 3M 550 Transparent Tape oder ganze Platten mit Adhesive Sealing Film gasdicht verschlossen. Die verschlossenen Strips oder Mikrotiterplatten werden nachfolgend in den Thermoblock eines ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System eingesetzt und die Lochmaske zentriert

DE 2011308 U1

- über den Kavitäten positioniert. Danach Gerätedeckel des ABI PRISM-7700 vorsichtig schließen, ohne dabei die Lochmaske zu verschieben!
8. PCR-Programm starten (10 min bei 95°C, danach 40 PCR-Zyklen einer 2-Step PCR: 30 sec bei 95°C, 2 min bei 59°C)
 9. Nach Programmende erfolgt die automatische Auswertung der Amplifikationskurven und die Darstellung der Referenzkurven (Abb.3).

Ergebnisse

Aus Abb. 3 ist ersichtlich, daß eine Linearität der Referenzkurve über einen Gliadin-Konzentrationsbereich von ca. 200 pg bis 50 ng/ml gewährleistet ist. Werden Gliadin-Konzentrationen von 100 pg/ml zur Berechnung der Eichkurve einbezogen (Abb.3A), nimmt die Linearität deutlich ab, daran ersichtlich, daß der Anstieg der Referenzkurve (Slope) < 3 ist (Optimal: 3,3-3,4, entsprechend ca. 100 % Effizienz der Amplifizierung). Somit ist von einer unteren Nachweisgrenze bezogen auf das Ausführungsbeispiel von etwa 200 pg Gliadin/ml auszugehen, was einer mindestens 15fach höheren Sensitivität verglichen mit konkurrierenden ELISAs entspricht (untere Nachweisgrenzen bislang 3 ng/ml bzw. 4 ng/ml oder 156 ng/ml in [Sorell L. et al 1998, FEBS Lett. 439: 46-50, Ellis H.J. et al 1998, Gut 43: 190-195, Skerrett J.H. und Hill A.S. 1991, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 74: 257-264]).

Schutzansprüche

1. Universell einsetzbare, zweiteilige Verschlusvorrichtung für Mehrfachreaktionsräume, dadurch gekennzeichnet, daß sie
 - a) als Abdichtungsmaterial der Reaktionsräume ein transparentes, strahlendurchlässiges, gasdichtes, hitzestabiles Verschlusmaterial aufweist, über das
 - b) eine deckungsgleiche, flexible Lochmaske positioniert ist, die aus einem flexiblen und thermostabilen Material besteht und mindestens soviel Fenster mit geeignetem Durchmesser aufweist, wie Mehrfachreaktionsräume vorhanden sind, welche so angeordnet sind, daß sie sich beim Auflegen auf den Mehrfachreaktionsraum jeweils exakt über der Mitte der Einzelkavitäten befinden.
2. Verschlusvorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Materialien a) und b) so angeordnet sind, daß sowohl eine Anregung von zugehörigen Chromophoren durch Energiequellen verschiedener Wellenlänge als auch eine Detektion simultan direkt im Reaktionsraum ungehindert durch die zweiteilige Verschlusvorrichtung erfolgen kann, wobei gleichzeitig eine gegebenenfalls erforderliche optimale Wärmeübertragung auf die Reaktionsräume sowie Volumenkonstanz im Detektionsansatz durch geeignete Gegenheizungsvorrichtungen möglich ist.
3. Verschlusvorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Abdichtungsmaterial a) um transparente, selbstklebende Folien oder Klebestreifen handelt.
4. Verschlusvorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem thermostabilen Material b) um Silikongummi handelt.

210701

Abb. 1

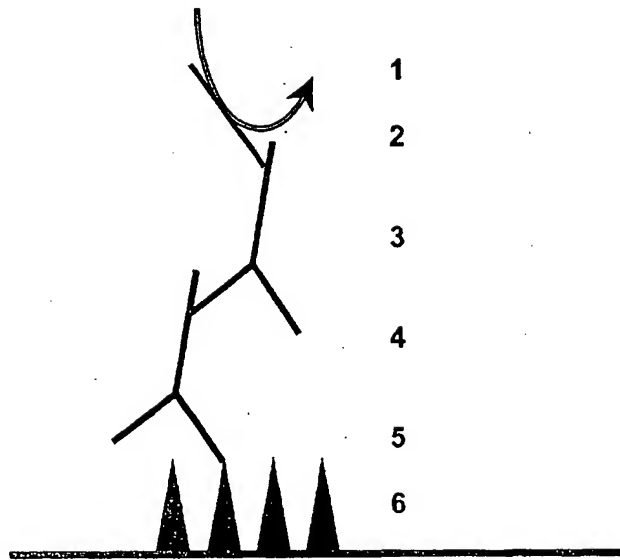
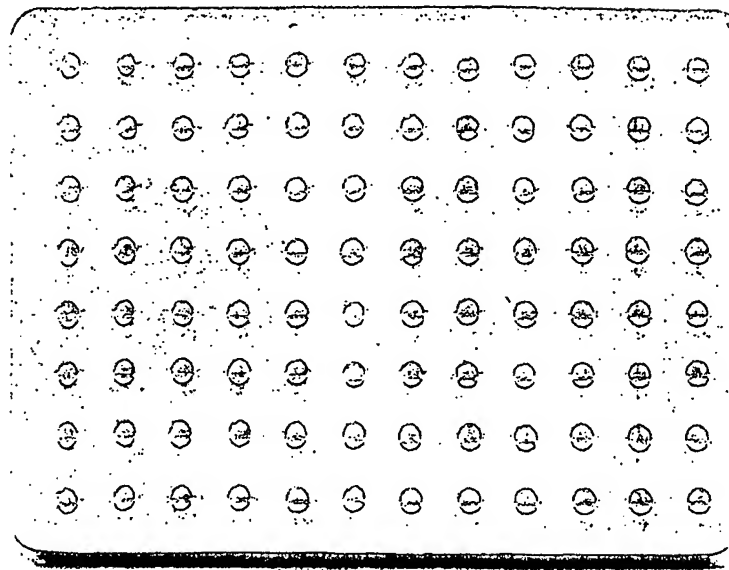


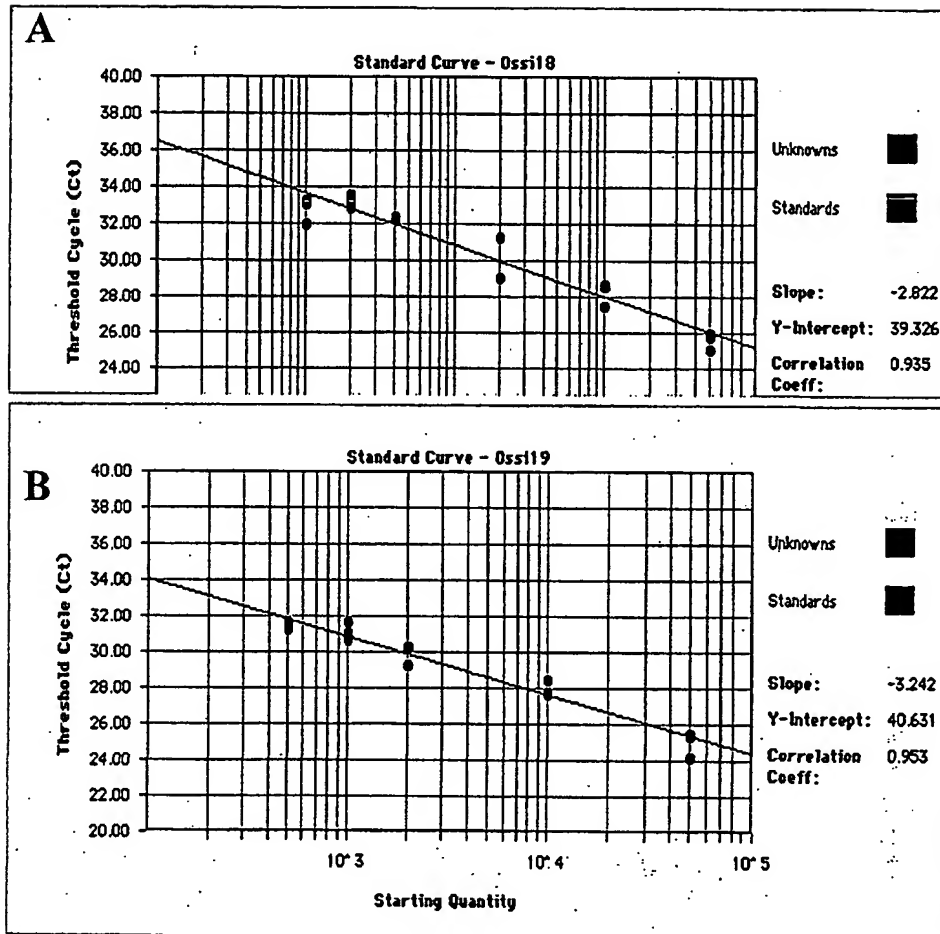
Abb. 2



DE 201 11 308 U1

210701

Abb. 3:



DE 201 11 308 U1